

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara *in vitro* dengan *post test only control group design* untuk menguji efek antibakteri ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap bakteri *Acinetobacter baumannii*.

Uji sensitivitas bakteri yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah dengan metode dilusi agar untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan metode dilusi tabung untuk menentukan kadar bunuh minimal (KBM).

4.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Acinetobacter baumannii* dari spesimen darah pasien di RSSA yang kemudian dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah perlakuan yang diberikan ada 7 dengan konsentrasi yang berbeda. Jumlah pengulangan yang dilakukan dapat diketahui dengan rumus (Lukito, 1998):

$$p(n-1) \geq 16$$

$$7(n-1) \geq 16$$

$$7n \geq 23$$

$$n \geq 3,28$$

Keterangan : n = Jumlah pengulangan

p = Jumlah kelompok sampel

Kelompok sampel terbagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol bakteri (konsentrasi 0%) dan

kontrol bahan (konsentrasi 100%). Sedangkan kelompok perlakuan terdiri atas 5 konsentrasi (konsentrasi a, b, c, d dan e). Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar pengulangan yang diperlukan adalah sebanyak 4 kali.

4.3 Identifikasi Variabel

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perbedaan konsentrasi ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) yaitu 0%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% dan 0,7%. Konsentrasi tersebut didapatkan melalui eksplorasi.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada media NAP dan jumlah koloni bakteri *Acinetobacter baumannii* pada media NAP yang dihitung menggunakan *colony counter*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - Oktober 2013.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat

Alat- alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah pisau, alat inkubasi, bunsen, blender, *evaporator set*, *ose*, *colony counter*, timbangan analitik,

spektrofotometer, mikroskop, *beaker glass*, vortex, kertas saring, obyek glass, pipet ukur, kapas lidi, tabung reaksi dan *microbact*.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk kering kulit buah manggis, pelarut etanol 96%, biakan murni *Acinetobacter baumannii*, media padat NAP (*Nutrient Agar Plate*), media cair NB (*Nutrient Broth*), media agar *MacConkey*, NaCl 0,9%, bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, minyak emersi, dan kertas saring.

4.6 Definisi Operasional

- a. Kulit manggis yang digunakan adalah kulit manggis berbentuk serbuk yang diperoleh dari Materia Medika Kota Batu dan sudah divalidasi. Pembuatan ekstrak kulit buah manggis menggunakan metode maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) dengan pelarut etanol 96% dilakukan di laboratorium politeknik negeri malang.
- b. Bakteri *Acinetobacter baumannii* yang digunakan adalah bakteri *Acinetobacter baumannii* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- c. KHM (Kadar Hambat Minimal) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit buah manggis yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Acinetobacter baumannii* pada media NAP. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri sama sekali pada media NAP yang berisi ekstrak etanol kulit manggis setelah diinkubasikan selama 18-24 jam (Dzen *dkk.*, 2003).

- d. KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit buah manggis yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Acinetobacter baumannii*. Hal ini ditandai oleh jumlah koloni pada media agar padat (NAP) yang telah dilakukan penggosokan dengan satu selarutan ekstrak etanol kulit buah manggis yang telah diberi bakteri uji tersebut, dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum* (OI). Perhitungan jumlah koloni menggunakan *colony counter* (Dzen, dkk., 2003).
- e. *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM. Kontrol bahan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril. Kontrol bahan dibuat dari ekstrak etanol kulit buah manggis sebanyak 1 ml dan tidak dicampur dengan bakteri *Acinetobacter baumannii*.
- f. Kontrol bakteri digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol bakteri dibuat dari larutan bakteri *Acinetobacter baumannii* yang telah distandarisasi dengan spektrofotometri dan tidak dicampur dengan ekstrak etanol kulit buah manggis.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Bakteri *Acinetobacter baumannii*

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram adalah sebagai berikut :

- a. Membuat sediaan apusan bakteri pada *object glass*, mengeringkan di udara, kemudian difiksasi.

- b. Menuangkan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air.
- c. Menuangkan larutan lugol sebagai *mordant*.
- d. Menuangkan alkohol 96% sebagai *decolorized* selama 5-10 detik.
- e. Menuangkan safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
- f. Mengeringkan sediaan dengan kertas saring, meneteskan minyak imersi, kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali (Santoso, 2011).

Pada hasil preparat yang terlihat dibawah mikroskop akan tampak bakteri dengan bentuk batang berwarna merah, yang menunjukkan *Acinetobacter baumannii* merupakan bakteri gram negatif.

4.7.1.2 Penanaman Kultur Bakteri pada Media *MacConkey*

- a. Spesimen ditanam pada media *selenite broth* yang kemudian diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 16-24 jam.
- b. Biakan pada *selenite broth* diambil 1 ose, kemudian ditanam pada agar *MacConkey* untuk mendapat koloni terpisah kemudian pada suhu 37°C selama 16-24 jam
- c. Apabila didapatkan koloni berwarna merah, berarti bakteri tersebut dapat memfermentasi laktosa. Apabila tidak memfermentasikan laktosa maka koloni yang tumbuh tidak berwarna / pucat. Tujuan dilakukan kultur bakteri ini adalah untuk melihat morfologi koloni bakteri *Acinetobacter baumannii* dan mengetahui bahwa bakteri *Acinetobacter baumannii* tidak dapat memfermentasikan laktosa (Santoso dkk, 2011).

4.7.1.3 Pengujian *Microbact*

- a. Melakukan tes oksidase untuk menentukan kit yang akan digunakan, karena *Acinetobacter baumannii* merupakan bakteri gram negatif, yang akan member hasil negatif pada tes oksidase, maka digunakan *microbact 12A/E*.
- b. Mengambil 1 sampai 3 koloni bakteri yang dikultur pada NAP dan mencampurkan ke dalam 5 ml larutan NaCl 0,9% dengan menggunakan vortex.
- c. Membuka segel tempat uji strip.
- d. Menambahkan 4 tetes suspensi bakteri pada setiap cekungan.
- e. Menambahkan 2 tetes *Mineral Oil* (MB1093A) ke cekungan dengan warna hitam.
- f. Diinkubasi pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 18 – 24 jam.
- g. Setelah itu, dikeluarkan dari inkubator dan kemudian menambahkan reagen yang sesuai (pada cekungan ke 8 ditambahkan *indole* 2 tetes, kemudian dibaca setelah 2 menit; pada cekungan ke 10 ditambahkan reagen VP I dan VP II, masing-masing 1 tetes, kemudian dibaca setelah 15-30 menit; pada cekungan ke 12 ditambahkan reagen TDA 1 tetes, kemudian langsung dibaca).
- h. Mencatat hasil pada form laporan dan menginterpretasi dengan menggunakan *Microbact TM* (Oxoid, 2012).

4.7.2 Perbenihan

Koloni bakteri *Acinetobacter baumannii* ditanam pada *Nutrient Broth* dan diinkubasikan pada suhu $37^{\circ} - 37,5^{\circ}\text{C}$ selama 18 - 24 jam.

4.7.3 Preparasi Uji Bakteri

Perbenihan cair bakteri dari *Nutrient Broth* dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm. Melalui nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometer)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N_2 = Optical density (0,1= setara dengan 10^8 /ml)

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml. V adalah volume suspensi bakteri. Sehingga diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 ml. Konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml tersebut diencerkan dengan menambahkan 1 ml perbenihan (10^8 CFU/ml) ke dalam 9 ml NaCl untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1 ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9 ml *Nutrient Broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml. Kini suspensi bakteri telah siap digunakan untuk penelitian (Darusman, 2003).

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis

Proses pembuatan ekstrak etanol kulit buah manggis melalui 2 tahap yaitu :

a. Proses Ekstraksi (Metode Maserasi)

1. Kulit buah manggis dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan sisa-sisa tanah.
2. Proses selanjutnya adalah memotong kulit buah manggis menjadi kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan.
3. Kulit buah manggis dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 50°C sehingga kandungan air berkurang.
4. Setelah melalui proses pengeringan, kulit buah manggis dihaluskan dengan blender sehingga bentuknya menyerupai bubuk.
5. Bubuk ditimbang dan diambil sebanyak 100g (sampel kering).
6. Bubuk dibungkus kertas saring whatman no 41 dan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L.
7. Rendam dengan etanol 96% hingga volume 1L.
8. Aduk larutan sampai benar-benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap.
9. Proses perendaman dilakukan sebanyak 3 kali kemudian lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil (Singh, 2008).

b. Proses Evaporasi

1. Hasil maserasi yang berupa campuran etanol 96% dengan zat aktif kulit manggis dimasukkan ke dalam labu evaporasi.

2. Menyalakan *rotary* evaporator (alat pompa sirkulas air dingin dan alat pompa vakum).
3. Isi *Water bath* dengan air sampai penuh kemudian pasang semua rangkaian alat termasuk *rotary* evaporator.
4. Setelah itu pemanas *water bath* disambungkan dengan aliran listrik sehingga hasil maserasi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 70°C (titik didih etanol 96%). Larutan etanol 96% akan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
5. Hasil penguapan etanol 96 % dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
6. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental.
7. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian dioven selama 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstraksi 100%.
8. Apabila tidak sedang digunakan ekstrak kulit manggis tadi dapat disimpan dalam botol plastic tertutup kemudian disimpan dalam *freezer* (Singh, 2008).

4.7.5 Uji Efektivitas Antibakteri

a. Pengujian Dilusi Agar Untuk Menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal)

1. Siapkan 6 *plate* steril, beri tanda KK, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% dan 0,7%.
2. Masukkan 15 ml NAP agar ke dalam *plate* bertanda KK.

3. Masukkan 14,055 ml NAP agar ke dalam *plate* bertanda 0,3% lalu tambahkan 0,045 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
4. Masukkan 14,04 ml NAP agar ke dalam *plate* bertanda 0,4% lalu tambahkan 0,06 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
5. Masukkan 14,025 ml NAP agar ke dalam *plate* bertanda 0,5% lalu tambahkan 0,075 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
6. Masukkan 14,91 ml NAP agar ke dalam *plate* bertanda 0,6% lalu tambahkan 0,09 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
7. Masukkan 14,895 ml NAP agar ke dalam *plate* bertanda 0,7% lalu tambahkan 0,105 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
8. Diamkan media agar tersebut hingga memadat dan permukaannya menjadi kering.
9. Masukkan *plate* ke dalam inkubator selama 24 jam untuk memastikan agar dalam *plate* tidak terkontaminasi.
10. Bagi *plate* menjadi 4 bagian sama luas dengan spidol marker.
11. Setiap bagian pada masing-masing *plate* ditetesi 1 tetes bakteri *Acinetobacter baumannii* yang diambil pada suspensi bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml. Volume 1 tetes mikropipet setara dengan 10 μ l bakteri yang mengandung 10^4 CFU/ml.
12. Semua *plate* diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 35-37°C selama 24 jam. Kemudian amati koloni bakteri yang tumbuh. Media NAP dengan konsentrasi terendah yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri, ditentukan sebagai KHM. Penentuan nilai KHM dari beberapa konsentrasi tersebut menggunakan teknik *scoring*. Skor yang diberikan berupa +3, +2, +1, dan 0. Dengan ketentuan skor 0: tidak ada

pertumbuhan koloni, +1: pertumbuhan koloni tipis dapat dihitung, +2: koloni tipis dan tidak terhitung, +3: koloni tebal dan tidak terhitung (Cahyadi, 2011).

b. Pengujian Dilusi Tabung Untuk Menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM)

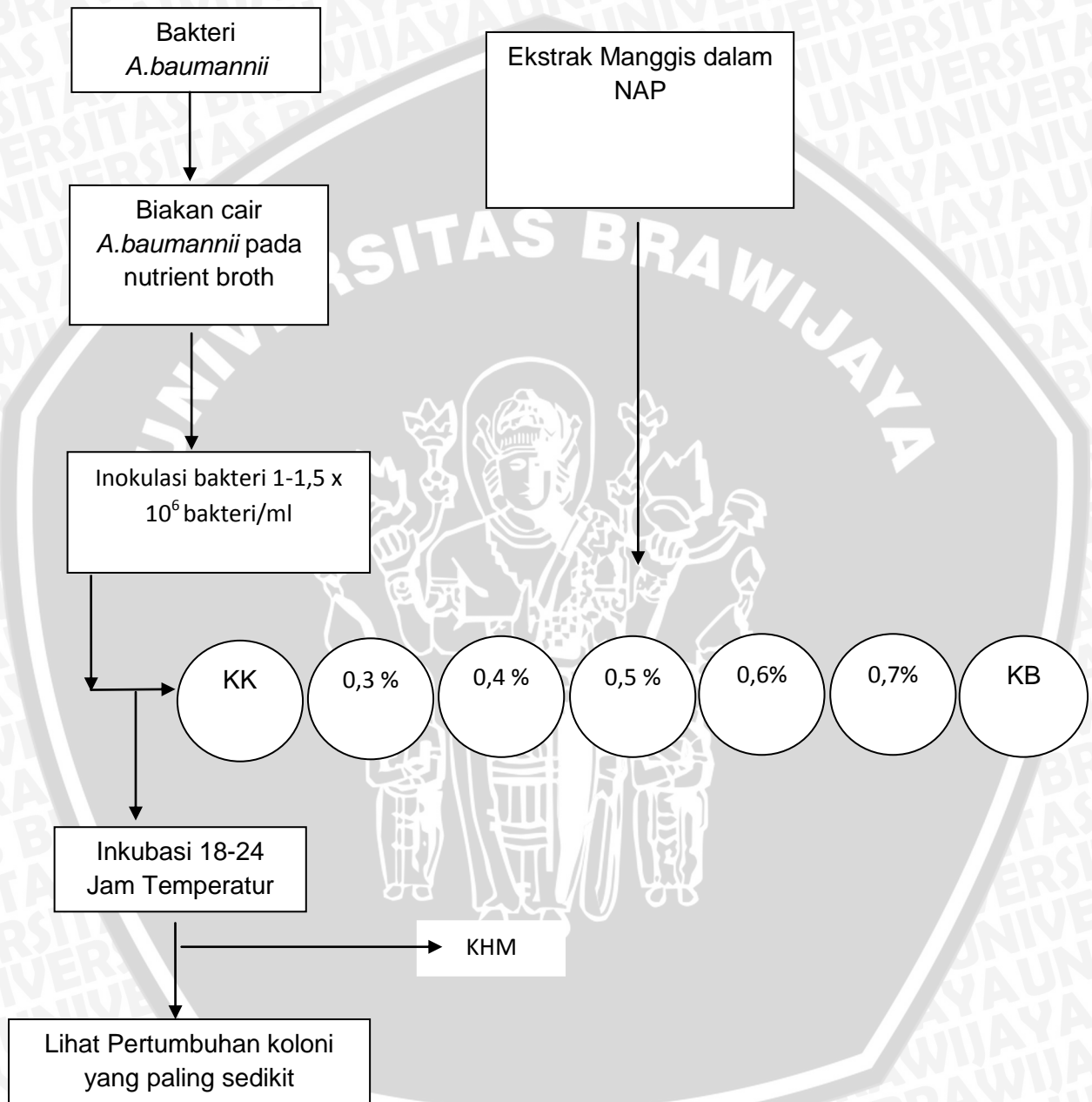
1. Sediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai control bahan (KB), dan 1 tabung sebagai control bakteri (KK).
2. Masukkan 0,997 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 0,3% lalu tambahkan 0,003 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
3. Masukkan 0,996 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 0,4% lalu tambahkan 0,004 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
4. Masukkan 0,995 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 0,5% lalu tambahkan 0,005 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
5. Masukkan 0,994 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 0,6% lalu tambahkan 0,006 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
6. Masukkan 0,993 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 0,7% lalu tambahkan 0,007 ml ekstrak etanol kulit buah manggis.
7. Masukkan 1 ml ekstrak etanol kulit manggis saja ke dalam tabung KB dan masukkan 1 ml suspensi bakteri saja ke dalam tabung KK.
8. Masukkan 1 ml suspensi bakteri *Acinetobacter baumannii* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml ke dalam tabung 1-6.
9. Ambil 1 ose bakteri dari tabung KK kemudian digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35-37°C.
10. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 35 - 37°C.

11. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Dilihat kekeruhan tabung untuk menentukan apakah ekstrak keruh atau tidak.
12. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil 1 ose (10 μ l) kemudian digoreskan pada NAP dan diinkubasi 18 - 24 jam pada suhu 35 - 37°C.
13. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI (Eucast, 2000).



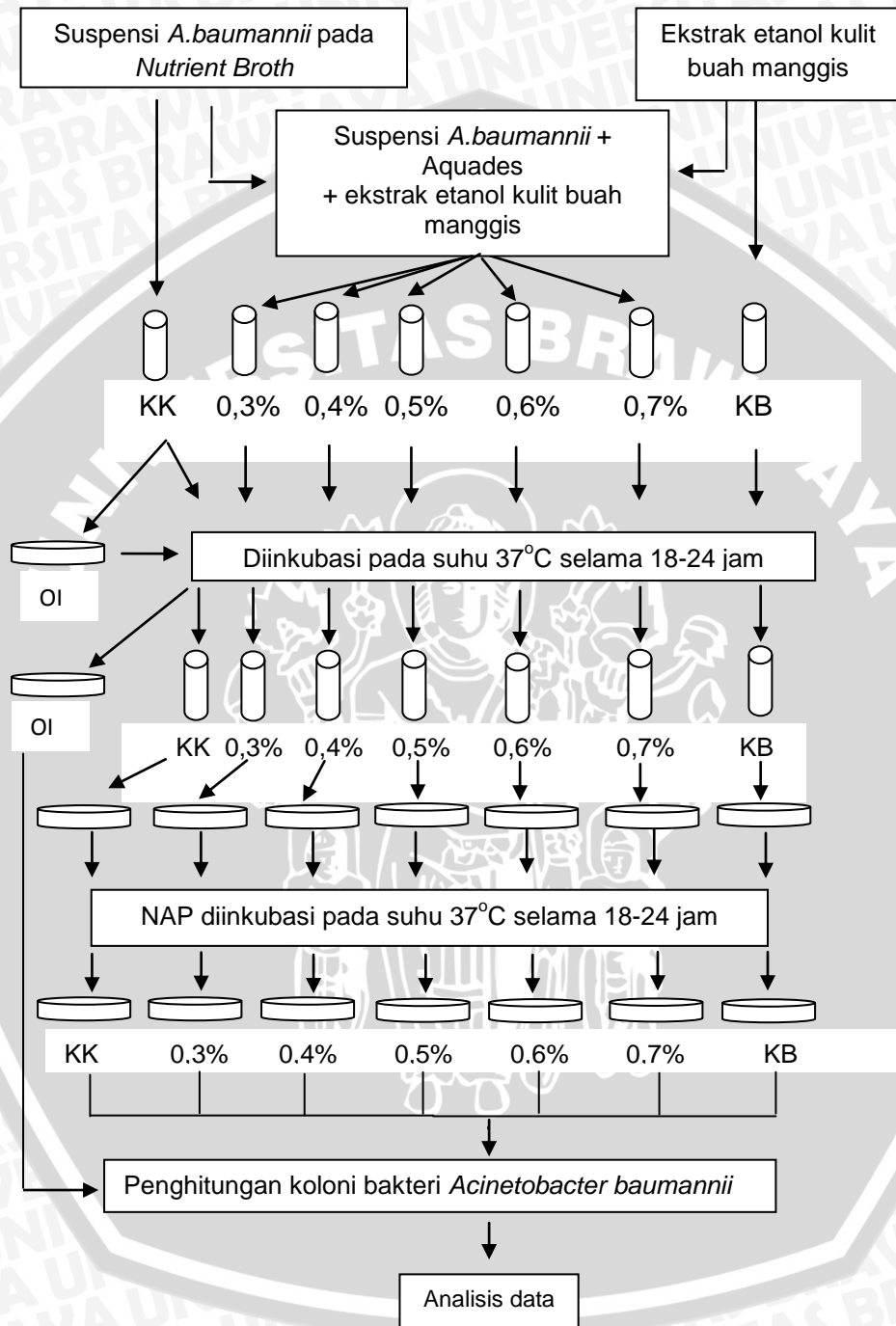
4.8 Alur Kerja Penelitian

4.8.1 Kadar Hambat Minimal (KHM)



Gambar 4.1 Skema Alur Kerja Penelitian Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis Terhadap Bakteri *Acinetobacter baumannii*.

4.8.2 Kadar Bunuh Minimal (KBM)



Gambar 4.2 Skema Alur Kerja Penelitian Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis Terhadap Bakteri *Acinetobacter baumannii*.

Keterangan: KK: Kontrol Bakteri OI : Original inoculum
 KB : Kontrol Bahan NAP: Nutrient Agar Plate

4.9 Analisis Data

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kualitatif (KHM) didapatkan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni pada media NAP. Data kuantitatif (KBM) didapatkan dengan menghitung jumlah koloni pada NAP menggunakan *colony counter*.

Uji statistik yang digunakan untuk data kuantitatif adalah uji normalitas-homogenitas *Kolmogorov-Smirnov*, uji beda, uji multi komparasi, uji korelasi dan uji regresi linier. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *software* analisis statistik (Dahlan, 2008).

